

**Isolierung und Identifizierung
einer 5, 8, 11, 14, 17 n-Eikosapentaensäure
aus Rinderherzmuskel**

Fritz Wintersberger

**Isolierung und Identifizierung
einer 5, 8, 11, 14, 17 n-Eikosapentaensäure
aus Rinderherzmuskel**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Fritz Wintersberger
aus
München

September 1959



5349/60

1. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Hörhammer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 12. 1959

Sonderdruck aus
Archiv der Pharmazie

292./64. Band, Heft 10, Seite 545—555

Verlag Chemie, GmbH, Weinheim / Bergstr.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1787. L. Hörhammer, F. Wintersberger und H. Wagner

Isolierung und Identifizierung einer 5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure aus Rinderherzmuskel*)

Aus dem Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München
Direktor: Prof. Dr. L. Hörhammer

(Eingegangen am 3. August 1959)

Die Tatsache, daß höher ungesättigte Fettsäuren für den tierischen Organismus Vitamincharakter besitzen und somit als essentiell im physiologischen Sinne bezeichnet werden können^{1) 2)}, hat zu einer Reihe von Arzneipräparaten geführt, in denen ungesättigte Fettsäuren pflanzlicher oder tierischer Herkunft als Konzentrate oder typische Bestandteile verwendet werden. Hieraus ergibt sich für den Analytiker die Aufgabe, alle Materialien, die als Fettsäurequelle in Frage kommen können, qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Besondere Aufmerksamkeit wird man dabei in Zukunft den Polyensäuren widmen müssen, da angenommen werden darf, daß diesen einige wichtige therapeutische Funktionen zukommen, die über die bloße Vitaminwirkung hinausgehen.

Bisher wurden solche Tetraen-, Pentaen- und Hexaensäuren der C₁₆-, C₁₈-, C₂₀- und C₂₂-Reihe aus den Phosphatiden von Säugetierorganen und Fischölen isoliert³⁻¹⁶). Im einzelnen fand man sie bei den Phosphatiden der Ratte³⁾, im Schweinehirn⁴⁾, Menschenhirn⁵⁾, in den Blutlipoproteiden⁶⁾, in Nebennierenphosphatiden^{7) 8)}, in der Rinderleber⁹⁻¹²⁾ und verschiedenen Fischölen¹³⁻¹⁶⁾. Während sich die Polyenfettsäuren der Fischöle vorwiegend dem Linolensäuretyp zuordnen lassen, gehören die ungesättigten Fettsäuren der Organphosphatide sowohl dem Linolen- wie dem Linolsäuretyp an¹³⁾.

Für den Beginn unserer systematischen Arbeiten wählten wir die Phosphatide des Rinderherzmuskels, die diesbezüglich noch unvollständig untersucht sind.

*) Herrn Professor Dr. Dr. h. c. H. P. Kaufmann zum 70. Geburtstag gewidmet.

¹⁾ G. O. Burr und M. M. Burr, J. biol. Chemistry 86, 587 (1930).

²⁾ G. Popják und E. Le Breton, „Biochemical Problems of Lipids“, London 1956, S. 463ff.

³⁾ J. F. Mead und W. H. Slaton jr., J. biol. Chemistry 219, 705 (1956).

⁴⁾ E. G. Hammond und W. O. Lundberg, J. Amer. Oil Chemists' Soc. 30, 438 (1953).

⁵⁾ E. Klenk und F. Lindlar, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 229, 74 (1955); ibidem 301, 156 (1955).

⁶⁾ G. A. Gillies, F. T. Lindgren und J. Cason, J. Amer. chem. Soc. 78, 4103 (1956).

⁷⁾ S. F. Herb, R. W. Riemenschneider und J. Donaldson, J. Amer. Oil Chemists' Soc. 28, 55 (1951).

⁸⁾ S. F. Herb, L. P. Witnauer und R. W. Riemenschneider, ibidem 28, 505 (1951).

⁹⁾ E. Klenk und A. Dreike, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 300, 113 (1955).

¹⁰⁾ E. Klenk und W. Montag, Liebigs Ann. Chem. 604, 4 (1957).

¹¹⁾ E. Klenk und H. Tomuschat, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 308, 165 (1957).

¹²⁾ T. Shimooka und Y. Toyama, J. Oil Chemists' Soc. (Japan) 3, 167 (1954).

¹³⁾ E. Klenk und H. Brockerhoff, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 307, 272 (1957); ibid. 310, 153 (1958).

¹⁴⁾ E. Klenk und D. Eberhagen, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 307, 42 (1957).

¹⁵⁾ J. M. Whitcutt und D. A. Sutton, Biochem. J. 63, 469 (1956).

¹⁶⁾ O. Nøtveid, A. Rould, P. Sletness und S. Nordli, Swedish Inst. Food Preservation Res., Publ. Nr. 100, X 24 pp (1953); ref. C. A. 50, 9644 (1956).

Die bisher vorliegenden Angaben¹⁷⁻²¹⁾ beziehen sich nur auf die prozentuale Verteilung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren in einzelnen Phosphatiden. So bestimmten *E. Klenk* und *G. Krickau*¹⁷⁾ die Fettsäuren des Lecithins und der Cholinacetale und faßten die Polyensäuren der C₂₀-Reihe zu einer Fraktion zusammen. Bei *M. Gray* und Mitarbeitern¹⁸⁾ finden sich Tabellen über die Fettsäurezusammensetzung des Lecithins, Colaminkephalins und deren Lysoverbindungen sowie des Cardiolipins¹⁹⁾. *M. Faure* und *M. J. Morelec-Coulon*²⁰⁾ geben für die ungesättigten Fettsäuren des Monophosphoinositids eine Jodzahl von 220 an. Schließlich konnte *G. Richter*²¹⁾ als Fettsäurereste am Phosphatidylserin neben Stearinsäure Öl-, Linol- und Linolensäure nachweisen.

Darstellung

Als Ausgangsmaterial diente ein Lipoidtotalextrakt aus Rinderherzmuskel, der folgende Stoffe enthielt: Neutralfette, Cardiolipin, Cerebroside, Cholesterin und seine Ester, Plasmalogene, Sphingomyelin, Lecithin und Colaminkephalin und ihre Lysoverbindungen, Phosphatidylserin, Monophosphoinositid und Aminosäuren.

Aus den Gesamtfettsäuren, die wir durch Hydrolyse mit methanolischer Kalilauge erhielten und von unverseifbaren Anteilen befreiten, wurden die gesättigten Fettsäuren durch mehrmaliges Ausfrieren bei -20°C und -30°C aus Acetonlösung in Anlehnung an die Methode von *H. Debusch*²⁵⁾ abgetrennt (Niederschlag A). Die ungesättigten teilten wir durch weiteres Abkühlen auf -50°C (Niederschlag B), -70°C (Niederschlag C) und -90°C (Niederschlag D und verbleibende Lösung E) in vier weitere Fraktionen auf. Der ausgewaschene Niederschlag A bestand aus Palmitin- und Stearinsäure, sowie einer Spur Lignocerinensäure. Die Fraktion A wurde papierchromatographisch, die Fraktionen B, C, D, E zusätzlich durch Alkali-Isomerisierung nach *R. T. Holman* und *G. O. Burr*²⁶⁾ und Aufnahme des UV-Absorptionsspektrums auf ihre Zusammensetzung untersucht. In gleicher Weise kontrollierten wir den weiteren Verlauf des Isolierungsganges. Es zeigte sich erwartungsgemäß eine Zunahme der höher ungesättigten Fettsäuren von B (Jodzahl 102) nach E (Jodzahl 285) und eine gleichzeitige Abnahme der Ölsäure von B nach E und der Linolsäure von C nach E. Nur das Filtrat E, das wenig Ölsäure und Oxydationsprodukte, wenig Diene, hauptsächlich Tri- bis Pentaene und eine geringe Menge Hexaensäure enthielt,

¹⁷⁾ *E. Klenk* und *G. Krickau*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 308, 98 (1957).

¹⁸⁾ *M. Gray*, Biochem. J. 70, 425 (1958).

¹⁹⁾ *M. G. Mac Farlane* und *G. M. Gray*, Biochem. J. 67, 705 (1957).

²⁰⁾ *M. Faure* und *M. J. Morelec-Coulon*, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. 238, 411 (1954).

²¹⁾ *G. Richter*, Dissertation, München 1958.

²²⁾ *H. Thomasson*, Intern. Rev. Vitamin Res. 25, 62 (1953).

²³⁾ *E. Klenk* und *W. Bongard*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 291, 104 (1952).

²⁴⁾ *R. T. Holman*, Svensk kem. Tidskr. 68, 282 (1956).

²⁵⁾ *H. Debusch*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 304, 109 (1956).

²⁶⁾ *R. T. Holman* und *G. O. Burr*, Arch. Biochemistry 19, 474 (1948).

wurde zur weiteren Auftrennung der multiplikativen Verteilung nach *E. H. Ahrens* und *L. C. Craig*²⁷⁾ unterworfen.

Bei einer Verteilung über 100 Stufen mit dem dort angegebenen Lösungsmittelsystem ergab sich das Bild der Tabelle 1 (vgl. Abb. 1).

Tabelle 1

Ergebnis der 1. Craig-Verteilung des Filtrates E über 100 Stufen

Gruppe	Elemente	Fettsäuren
I	0—10	oxydierte Verunreinigungen
II	11—21	praktisch leer
III	22—25	Spuren von Hexaen- und C ₂₀ -Pentaensäure
IV	26—33	reine Pentaensäure
V	34—41	Pentaensäure, Arachidon- bzw. Linolensäure, Linolsäure
VI	42—53	wie in V, dazu Ölsäure
VII	54—61	Linolen- (Arachidon-), Linol- und Ölsäure
VIII	62—76	Linol- und Ölsäure
IX	77—91	Ölsäure, Erucasäure, evtl. Nervonsäure
X	92—100	praktisch leer

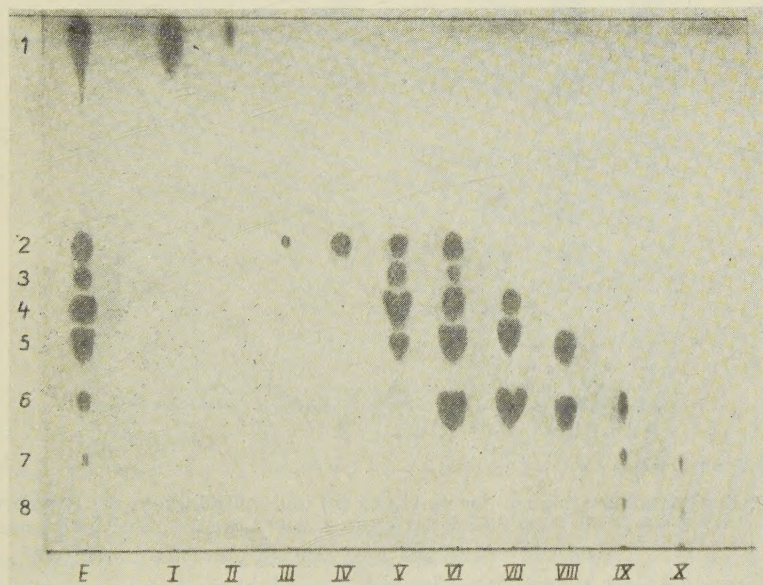


Abb. 1. Chromatogramm der 1. Craig-Verteilung der hoch ungesättigten Fettsäuren (vgl. Tab. 1)

- | | |
|---|-----------------|
| 1 = Oxydationsprodukte | 5 = Linolsäure |
| 2 = C ₂₀ -Pentaen- bzw. C ₂₂ -Hexaensäure | 6 = Ölsäure |
| 3 = Arachidonsäure | 7 = Erucasäure |
| 4 = Linolensäure | 8 = Nervonsäure |

Entwicklung: aufsteigend auf paraffiniertem Papier mit Essigsäure 90%; Sichtbarmachen mit Osmiumtetroxyd.

²⁷⁾ *E. H. Ahrens jr.* und *L. C. Craig*, *J. biol. Chemistry* 195, 299 (1952).

Die angefallene Menge reiner Pentaensäure war für Untersuchungen zu gering. Wir faßten deshalb alle diese Pentaensäure enthaltenden Fraktionen zusammen und unterwarfen sie weiteren *Craig*-Verteilungen. Dabei konnte jeweils nur eine geringe Menge Pentaensäure gewonnen werden. Aus insgesamt sechs *Craig*-Verteilungen über je 100 bzw. 150 Stufen, zuletzt in einem neuen System (Ameisensäure 85% — Azeton 98% — Benzin (Sdp. = 50–75° C) 1+6+8 Vol.), gewannen

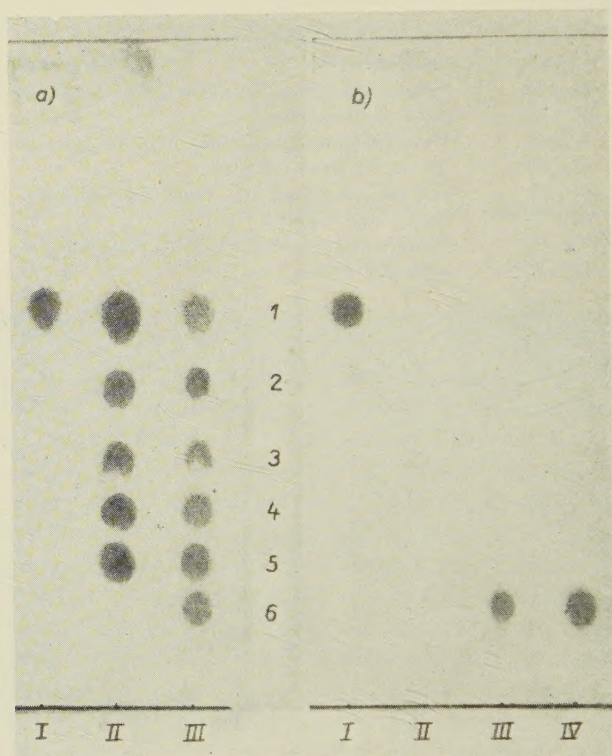


Abb. 2. Papierchromatogramme der partiellen (a) und vollständigen (b) Hydrierung der

C_{20} -Pentaensäure

- I = Ausgangssubstanz
 II und III = Hydrierungsprodukt
 IV = Arachinsäure, authentisch

- 1 = C_{20} -Pentaensäure
 2 = C_{20} -Tetraensäure
 3 = C_{20} -Triensäure

- 4 = C_{20} -Diensäure
 5 = C_{20} -Monoensäure
 6 = Eikosensäure

Entwicklung: aufsteigend auf paraffiniertem Papier mit Essigsäure 90%;

Sichtbarmachen der Flecke:

- I und II mit OsO_4 (Reagens auf Doppelbindungen)
 III und IV mit Kupferacetat und Kaliumferrocyanid
 (Reagens auf die Carboxylgruppe)

wir zusammen 50 mg papierchromatographisch einheitlicher Fettsäure in Form eines fast farblosen Öles. Dem Verhalten bei der Papierchromatographie und der multiplikativen Verteilung nach mußte es sich um eine C_{20} -Pentaensäure handeln.

Identifizierung

Zur Feststellung der Kettenlänge hydrierten wir die Substanz in 90%igem Äthanol unter Atmosphärendruck, erreichten aber nur eine partielle Hydrierung, was sich auf dem Papierchromatogramm durch das Auftreten von fünf ungesättigten Fettsäuren (mit 1—5 Doppelbindungen) zu erkennen gab. Eine vollständige Hydrierung gelang dagegen bei Verwendung von Eisessig als Lösungsmittel (Abb. 2). Das Resultat war reine Arachinsäure, die in R_f -Wert (0,12), Schmelzpunkt ($74^\circ C$) und Mischschmelzpunkt (74 — $75^\circ C$) (Kofler-Apparatur) mit authentischer Arachinsäure (74 — $75^\circ C$) übereinstimmte. Damit stand die Kettenlänge von 20 C-Atomen für unsere Fettsäure fest.

Daß es sich bei dieser Fettsäure um eine reine Pentaensäure handelte, ergab sich aus dem typischen Absorptionsmaximum bei $346 m\mu$ und den dazugehörigen Maxima bei $233 m\mu$, $268 m\mu$, $280 m\mu$, $300 m\mu$, $314 m\mu$ und $330 m\mu^{25}$ des UV-Spektrums nach der Alkali-Isomerisierung²⁶).

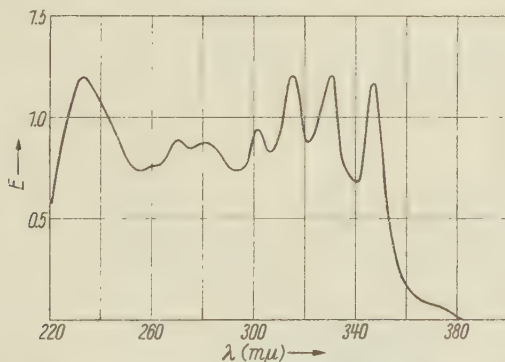


Abb. 3. UV-Absorptionsspektrum der C_{20} -Pentaensäure nach Alkali-Isomerisierung

Dieses Spektrum stimmt überein mit demjenigen der von *E. Klenk* und *D. Eberhagen* aus Dorschlebertran¹⁴) isolierten Eikosapentaensäure.

Eine weitere Bestätigung dieses Ergebnisses brachte die Bestimmung der Jodzahl (Halbmikro-Maßstab nach *H. P. Kaufmann*²⁸)). Sie ergab $371,5 = 89\%$ der Theorie (ber. 419,6)*).

*) Das Ergebnis der Jodzahlbestimmung mit 371 ist hinreichend genau (ber. 419,6). Eine C_{20} -Tetraensäure hätte die Jodzahl 340, eine C_{22} -Pentaensäure eine solche von 385 und die C_{22} -Hexaensäure 464. Die Jodanlagerung erfolgt bei Polyenfettsäuren nicht mehr quantitativ, auch kann die Probe schon geringfügig oxydiert worden sein. Da Dokosapolyensäuren nach dem Ergebnis der Hydrierung nicht in Betracht kamen, ist der Unterschied zu den für die benachbarten Polyensäuren berechneten Werten groß genug.

²⁸) DGF Einheitsmethoden C V 11c (53).

Zur Charakterisierung der Lage der Doppelbindungen führten wir die Pentaensäure in das Perozonid über, spalteten dieses oxydativ nach *E. Klenk* und *W. Bongard*²⁹⁾ mit Eisessig und Perhydrol und bestimmten die als Spaltstücke auftretenden Monocarbonsäuren papierchromatographisch nach *A. Seher*³⁰⁾, die Dicarbonsäuren nach *J. W. H. Lugg* und *B. T. Overell*³¹⁾. Wir fanden Propionsäure, Malon- und Glutarsäure, daneben Essig- bzw. Peressigsäure (letztere stammt aus dem zu der Erhaltung der Propionsäure absichtlich nicht restlos abgedampften Lösungsmittel) und wenig Bernsteinsäure (Abb. 4).

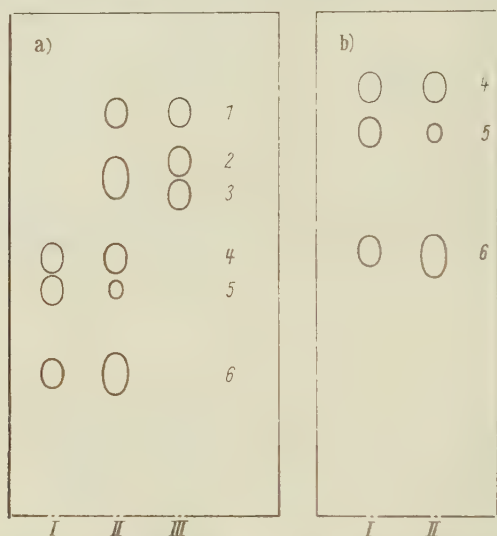


Abb. 4. Papierchromatogramme der Mono- (a) und Dicarbonsäuren (b) aus der Ozonidsplaltung

I = authentische Dicarbonsäuren

II = Ozonidsplaltprodukte

III = authentische Monocarbonsäuren

1 = Propionsäure

2 = Essigsäure

3 = Peressigsäure (Essigsäure + H_2O_2)

4 = Glutarsäure

5 = Bernsteinsäure

6 = Malonsäure

Entwicklung aufsteigend:

a) als Ammoniumsalze mit $In NH_3$ in 78%igem Äthanol,

b) als freie Säuren mit Butanol-Eisessig-Wasser (5 + 1 + 10)

Sichtbarmachen mit Bromphenolblau (0,04% in Äthanol)

Damit ist die Stellung der ersten Doppelbindung am dritten C-Atom von der Methylgruppe aus gerechnet und die Kette von drei C-Atomen von einer Doppel-

²⁹⁾ *E. Klenk* und *W. Bongard*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 290, 181 (1952).

³⁰⁾ *A. Seher*, Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 58, 401 (1956).

³¹⁾ *J. W. H. Lugg* und *B. T. Overell*, Nature (London) 160, 87 (1947).

bindung zur nächsten nachgewiesen. Ob die Glutarsäure das Bruchstück mit der ursprünglich vorhandenen Carboxylgruppe der Fettsäure darstellt, wurde nicht näher untersucht, ist aber anzunehmen.

Zuordnung der C₂₀-Pentaensäure

Da wir bei der Gewinnung dieser Fettsäure von einem Rinderherzlipoid-Gesamtextrakt ausgegangen waren, war noch zu untersuchen, in welchen Verbindungen diese hoch ungesättigte Fettsäure als lipophiler Anteil vorliegt.

Wir trennten daher den Extrakt durch eine *Craig*-Verteilung nach *G. Richter*²¹⁾ über 150 Stufen auf und erhielten die in Tabelle 2 aufgeführten Fraktionen *).

Tabelle 2
Fraktionierung des Herzgesamtextraktes

Fraktion	Lipide
I	Cardiolipin, Neutralfette, Plasmale
II	Cholesterin, Cerebroside
III	Cholesterin, Cerebroside, Colaminkephalin
IV	Colaminkephalin, Lecithin und deren Lysoverbindungen
V	wie IV, dazu Sphingomyelin
VI	wie V, dazu Phosphatidylserin
VII	Lecithin, Lysoverbindungen, Phosphatidylserin
VIII	Lysoverbindungen, Phosphatidylserin, Monophosphoinositid, Aminosäuren
IX	Monophosphoinositid, Aminosäuren

Wir stellten aus allen Fraktionen die Fettsäuren dar, untersuchten sie papierchromatographisch und nahmen nach Abtrennung der gesättigten Fettsäuren durch Tiefkühlkristallisation und nachfolgende Alkali-Isomerisierung das UV-Spektrum der ungesättigten Fettsäuren auf. Hiernach fand sich unsere C₂₀-Pentaensäure sowohl in den Plasmalogenen, im Cardiolipin und Cholesterinanteil als auch im Lecithin, Colaminkephalin und den Lysoverbindungen. Daß diese Pentaensäure in den Neutralfetten vorkommt, ist nicht anzunehmen, obwohl wir diese nicht getrennt untersuchten. Dagegen kann ihre Abwesenheit im Sphingomyelin, Phosphatidylserin und Monophosphoinositid als gesichert gelten.

Diese Ergebnisse stimmen mit den oben erwähnten Arbeiten¹⁷⁻²¹⁾ über die Fettsäuren aus Rinderherz-Phosphatiden insoweit überein, als man bisher C₂₀-Polyenfettsäuren nur bei Lecithin, Colaminkephalin und deren Lysoverbindungen¹⁷⁻¹⁸⁾, bei Cardiolipin¹⁹⁾ und Cholinacetalen¹⁷⁾ aufgefunden hat.

Zusammenfassung und Diskussion

Aus einem Rinderherzphosphatidextrakt gelang die Isolierung einer Polyenfettsäure, für die auf Grund der Hydrierung, des UV-Spektrums nach Isomerisierung und des Ozonidabbaues die Konstitution einer 5,8,11,14,17 n-Eikosapen

*) Wir danken Herrn Dr. *G. Richter*, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, für die freundliche Überlassung der Fraktionen.

taensäure ermittelt werden konnte. Diese Säure wurde bisher nur zweimal, und zwar aus Dorschlebertran¹⁴⁾ und aus Rinderleberphosphatiden¹⁰⁾ gewonnen. Nach *E. Klenk*¹⁴⁾ stimmt diese sehr wahrscheinlich mit der von *S. F. Herb* und Mitarbeitern⁸⁾ aus Nebennieren isolierten Eikosapentaensäure überein, während eine Identität mit der von *J. M. Whitcutt* und *D. A. Sutton* beschriebenen Säure¹⁵⁾ aus Sardinöl in Frage steht.

Der Anordnung der Doppelbindungen nach gehört die isolierte Säure dem Linolensäuretyp an, da die erste Doppelbindung (wie bei der Linolensäure) zwischen dem dritten und vierten C-Atom von der endständigen Methylgruppe aus gerechnet, liegt. Nach neuen Anschauungen²²⁻²⁴⁾ ist diese Struktur für die Beseitigung eines Teiles der Vitaminmangelerscheinungen erforderlich, andererseits soll eine zusätzliche Doppelbindung in Richtung auf die Carboxylgruppe die biologische Aktivität noch weiter erhöhen. Die aufgefundene Pentaensäure erweitert die Kenntnisse über die Polyensäuren der Rinderherzphosphatide und zeigt, daß Organe mit hohem Energieumsatz eine reiche Polyensäurequelle darstellen.

Der Fa. *Etapfarm*, Wien, sind wir für die zur Verfügung gestellten Extrakte und die damit verbundene Förderung der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Der Fa. *Linde A. G.*, Höllriegelskreuth bei München, danken wir für die Hilfe bei der Durchführung der Tiefkühlung, ebenso

Herrn Professor Dr. *Huisgen*, Direktor des Instituts für Organische Chemie der Universität München, für die Bereitstellung eines Ozonisators.

Herr Dr. *Schönenberger*, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, stellte uns Platinoxid für die Hydrierung zur Verfügung, wofür wir gleichfalls herzlich danken.

Experimenteller Teil

Hydrolyse

40 g des Lipoidtotalextraktes wurden mit 10 g Ascorbinsäure und einer zur Lösung ausreichenden Menge 15%iger Kalilauge in 90%igem Methanol 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach Verdünnen mit der doppelten Menge Wasser schüttelten wir die unverseifbaren Anteile 3mal mit gleichen Teilen Petroläther aus, vereinigten die Petrolätherauszüge und schüttelten mit Wasser zurück. Die zusammengegebenen wäbrig-methanolischen Lösungen wurden nach dem Ansäuern mit verdünnter Salzsäure auf p_H 2,0 3mal mit gleichen Teilen Äther ausgeschüttelt, die ätherischen Auszüge mit Wasser säurefrei gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet.

Die Verwendung von Ascorbinsäure hat sich als ausreichender Oxydationsschutz bewährt, macht aber den Zusatz von Wasser zur methanolischen Lauge notwendig. Beim Ausschütteln der Fettsäuren aus der angesäuerten Seifenlösung bleibt die Ascorbinsäure in der wäßrigen Lösung.

Zur weiteren Fraktionierung wurden die Gesamtfettsäuren (19,5 g) nach dem Abdampfen des Äthers in 500 ml Azeton aufgenommen und in die Kühltruhe gegeben.

Fraktionierung der Fettsäuren

Die Lösung der Gesamtfettsäuren blieb 14 Stunden bei $-20^\circ C$ in der Kühltruhe, worauf vom ausgefallenen Niederschlag abfiltriert und dieser mit ebenso abgekühltem Azeton gewaschen wurde. Die Fraktionierung wiederholten wir je 2mal bei $-20^\circ C$ und $-30^\circ C$. Die Niederschläge wurden vereinigt (A 4,5 g), die Waschlösung aber nicht weiterverarbeitet, da sie bereits wieder gesättigte und ungesättigte Fettsäuren enthielt. Das

Filtrat der letzten Fällung unterwarfen wir in gleicher Weise je 1mal bei -50°C (Niederschlag B; 1,4 g), -70°C (Niederschlag C; 2,6 g) und -90°C (Niederschlag D; 0,1 g und verbleibende Lösung E; 3,3 g) der Tiefkühlkristallisation.

Die Abtrennung der gesättigten Fettsäuren durch Tiefkühlkristallisation erfolgt beim Arbeiten in der Kühlzentrifuge nur sehr unvollständig. Besser bewährt hat sich das Ausfrieren und Abfiltrieren in der Tiefkühltruhe, was auch das Auswaschen der Niederschläge bei gleicher Temperatur erleichtert. Die Ausfällung der gesättigten Fettsäuren erfolgt auch bei -30°C nur dann hinreichend quantitativ, wenn das Filtrat eingengt und wiederholt auf diese Temperatur gebracht wird. Geringste Mengen bleiben wahrscheinlich immer in den als Lösungsmittel wirkenden Ölen zurück. *G. di Modica*³²⁾ läßt zur Gewinnung reiner Linol- und Linolensäure 8mal bei -70°C ausfrieren.

Multiplikative Verteilung

Alle Verteilungen wurden in einer geschlossenen, vollautomatischen Apparatur nach *v. Metzsch*³³⁾ der Fa. Otto Kühn, Göttingen, mit 160 Elementen von je 50 ml Phasenvolumen durchgeführt. Die Arbeiten erfolgten unter CO_2 -Schutz, um Oxydation durch den Luftsauerstoff auszuschließen.

1. Verteilung des Filtrates E (1,8 g hoch ungesättigte Fettsäuren) über 100 Stufen (s. Abb. 1) nach *E. H. Ahrens* und *L. C. Craig*²⁷⁾ mit dem System n-Heptan-Acetonitril-Eisessig-Methanol (4 + 1 + 1 + 1). Dieses für die multiplikative Verteilung von Öl-, Linol- und Linolensäure angegebene System ist für die Abtrennung unserer C_{20} -Pentaensäure, die diese Reihe in analoger Weise über die Linolensäure hinaus fortsetzt, ebenfalls geeignet, wenn auch für die beiden letzten Glieder weniger wirksam als für die beiden ersten. Infolge des verhältnismäßig hohen Siedepunktes von Heptan ist es jedoch bereits schwer flüchtig. Da zum schonenden Eindampfen der Verteilungsfractionen das Gemisch nur bis maximal 35°C erwärmt werden sollte, suchten wir nach leichter flüchtigen Systemen. Das Gemisch Ameisensäure 85%-Azeton 98%-Benzin (Sdp. $50-75^{\circ}\text{C}$) (1 + 6 + 8) verhindert Assoziation und Dissoziation, trennt fast ebenso gut (Verteilungskoeffizienten werden noch bestimmt), ist leicht flüchtig und hat reduzierende Eigenschaften.

Die weiteren Verteilungen wurden mit diesem System über je 150 Stufen durchgeführt. Es kamen nur frisch destillierte Lösungsmittel zur Verwendung. Nach beendeter Verteilung wurde der Inhalt je zweier Elemente vereinigt, im Vakuum bei maximal 35°C das Lösungsmittel abgedampft und der Inhalt der einzelnen Elemente nach dem Ergebnis der Papierchromatographie so zusammengefaßt, daß wir 3 Fraktionen erhielten: I = reine Pentaensäure (bei 1. Verteilung Element 26–33), II = dieselbe Säure in Mischung mit anderen (34–53) und III = die übrigen Fettsäuren (54–91). Die Fraktion II wurde dann weiteren Craig-Verteilungen zugeführt.

Bei der multiplikativen Verteilung bleiben Oxydationsprodukte ungesättigter Fettsäuren sehr gut in den ersten Elementen (0–10) liegen, was eine gute Reinigungsmöglichkeit ergibt, andererseits aber keinen Kreisprozeß erlaubt. Für den Zweck der Reinigung von Oxydations- und Polymerisationsprodukten erspart die Craigverteilung die Überführung der Fettsäuren in die Methylester und die Destillation. Die fraktionierte Destillation der Ester erspart sie nur insoweit, als zwar Fettsäuren mit gleicher C-Atomzahl aber unterschiedlicher Anzahl von Doppelbindungen getrennt werden, nicht aber sog. „kritische Paare“³¹⁾, wie z. B. Myristin-Linolensäure, Laurin-Linolensäure, C_{20} -Pentaensäure- C_{22} -Hexaensäure u. a., d. h. Fettsäuren, die die gleichen Verteilungskoeffizienten haben.

³²⁾ *G. Di Modica* und *P. F. Rossi*, *Chim. analyt. que* 34, 271 (1952).

³³⁾ *F. A. v. Metzsch*, *Chemie-Ing. Techn.* 25, 66 (1953).

³¹⁾ *H. P. Kaufmann* und *H. Kirschneck*, *Fette, Seifen einschl. Austrichmittel* 58, 492 (1956).

In unserem Falle war die sonst übliche Darstellung und Fraktionierung der Fettsäuren über die Methylester deshalb überflüssig, weil 1. oxydative Verunreinigungen durch die Craig-Verteilung leicht zurückgehalten wurden und 2. neben der C_{20} -Pentaensäure keine C_{22} -Hexaensäure vorlag. Hier liegen die Verhältnisse gleich wie bei der Papierchromatographie der Fettsäuren auf paraffiniertem Papier³⁵), d. h. alle Fettsäuren haben gleichen Verteilungskoeffizienten bzw. R_f -Wert, deren Kohlenstoffkette bei gleichzeitigem Vorhandensein einer weiteren Doppelbindung um 2 C-Atome länger ist.

Papierchromatographie

Bei allen Verfahren wurde Schleicher & Schüll-Chromatographierpapier Nr. 2043 b verwendet, im Falle c) das gleiche mit Salz- und Flußsäure gewaschen.

a) Für die höheren Fettsäuren chromatographierten wir in Anlehnung an die Methoden von *J. Pokorny*³⁵) und *J. Spiteri*³⁶) auf paraffiniertem Papier.

Herstellung des Papiers: Über Nacht einstellen in 20%ige Lösung von Paraffinum liquidum DAB 6 in Petroläther nach Art der aufsteigenden Chromatographie und anschließend 30 Min. an der Luft trocknen. Laufmittel: 90%ige Essigsäure; aufsteigende Technik 25–30 cm in 20–24 Stdn. Sichtbarmachen der Flecke mit 1%iger Kupferacetatlösung und 1%iger Kaliumferrocyanidlösung, zum Nachweis der ungesättigten Fettsäuren Behandlung mit Osmiumtetroxyd nach *M. H. Hack*³⁷).

b) Für die Erkennung der bei der Ozonidspaltung auftretenden Dicarbonsäuren chromatographierten wir die essigsäure Lösung nach *J. W. H. Lugg* und *B. T. Overell*³¹) aufsteigend mit der Oberphase des Systems n-Butanol-Eisessig-Wasser (5 + 1 + 10).

Für den Nachweis der Mono- und Dicarbonsäuren nebeneinander machten wir eine Probe der essigsäuren Lösung ammoniakalisch und chromatographierten sie nach der von *A. Seher*³⁰) für Dicarbonsäuren angegebenen Methode ebenfalls aufsteigend (Laufstrecke ca. 24 cm) mit In Ammoniak in 78%igem Äthanol als Fließmittel. Propionsäure liefert dabei einen R_f -Wert von 0,80, Essigsäure von 0,70, Peressigsäure von 0,64. Die Anfärbung erfolgte für b) und c) mit Bromphenolblaulösung (0,04%ig in Äthanol).

Alkali-Isomerisierung

Nach *R. T. Holman* und *G. O. Burr*²⁶) erhitzen wir 1,5 mg der isolierten Fettsäure bzw. des Fettsäuregemenges mit 1 ml 23%iger Kalilauge in Äthylenglykol 8 Min. auf 180° C, kühlen ab und verdünnen mit Methanol p. a. (*Merck*) auf 50 ml. Die Aufnahme des UV-Spektrums erfolgte im Zeiss Opton-Spektralphotometer M 4 Q gegen eine ebenso behandelte Glykol-Kalilauge als Blindlösung (Abb. 3).

Hydrierung

Wir hydrierten 7,4 mg Substanz, in 5 ml Eisessig p. a. (*Merck*) gelöst, unter Zusatz von 10 mg Platinoxid als Katalysator in einer abgeschlossenen Apparatur (Type MHYI der Fa. Erich Eydam, Kiel) bei Atmosphärendruck. Die Wasserstoffaufnahme nahm etwa 2 Stdn. in Anspruch. Das Hydrierungsprodukt reinigten wir durch zweimaliges Umfällen aus Eisessig-Lösung mit Wasser und verwendeten es zur Bestimmung des Mischschmelzpunktes.

Ozonisierung und Ozonidspaltung

Durch die Lösung von 10 mg Substanz in 15 ml Chloroform p. a. leiteten wir bei 0° C einen mäßigen Sauerstoffstrom, der durch einen 5-zelligen Siemensschen Ozonisator mit Ozon angereichert war. Nach zweistündiger Einwirkung war die Ozonisierung vollständig

³⁵) *J. Pokorny*, Naturwissenschaften 43, 375 (1956).

³⁶) *J. Spiteri*, Bull. Soc. Chim. biol. 36, 1355 (1954).

³⁷) *M. H. Hack*, Biochem. J. 54, 602 (1953).

was sich durch das Fehlen der ursprünglichen C_{20} -Pentaensäure auf dem Papierchromatogramm zu erkennen gab.

Zur Spaltung des Ozonids dampften wir das Chloroform schonend ab, versetzten nach *E. Klenk* und *W. Bongard*²⁹⁾ mit 6 ml Eisessig p. a. und 4 ml Perhydrol und hielten die Lösung im Thermostaten für 40 Stunden bei 35° C. Anschließend wurde die Lösung zur Zerstörung evtl. gebildeter Persäuren 5 Min. gekocht und schließlich bei 30° C im Vakuum bis auf etwa 5 Tropfen abgedampft. Dadurch blieb auch die gebildete Propionsäure (Sdp. = 140,9° C) erhalten.

Anschrift: Prof. Dr. L. Hörhammer. Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München 2, Karlstr. 29.

Lebenslauf

Am 16. Dezember 1931 wurde ich als Sohn des Oberkellners Max Wintersberger und seiner Ehefrau Therese, geb. Stadelmayer, in München geboren.

Nach 4-jährigem Besuch der Volksschule an der Luisenstraße trat ich im Herbst 1942 an die Wittelsbacher Oberschule über, an der ich 1951 die Reifeprüfung ablegte.

Meine Berufsausbildung begann ich mit einer zweijährigen Tätigkeit als Apotheker-Praktikant in der Kronen-Apotheke zu München, welche ich im September 1953 mit der pharmazeutischen Vorprüfung abschloß. Im Wintersemester 1953 nahm ich an der hiesigen Ludwig-Maximilians-Universität das Pharmazie-Studium auf und bestand im November 1956 das pharmazeutische Staatsexamen. Im November 1957 erhielt ich die Bestallung als Apotheker.

Am 29. August 1958 verehelichte ich mich mit Fräulein Dorothea Fritz aus Ludwigsburg/Württ.

Im Dezember 1956 begann ich am Universitätsinstitut für pharmazeutische Arzneimittellehre unter Leitung von Herrn Prof. Dr. L. Hörhammer mit der vorliegenden Arbeit. Sie wurde im August 1959 abgeschlossen.

